

Aus dem Physiologischen Institut
der
Johannes Gutenberg - Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. G. Thews

**Eine neue Methode zur simultanen pO_2 -
Messung und Aktionspotentialsableitung mit
derselben Mikroelektrode**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der

Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von

Stefan Kunke

aus Wiesbaden

MAINZ 1971

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut
der
Johannes Gutenberg – Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. G. Thews

Eine neue Methode zur simultanen pO_2 – Messung und Aktionspotentials-
ableitung mit derselben Mikroelektrode

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes Gutenberg – Universität Mainz

vorgelegt von
Stefan Kunke
aus Wiesbaden

MAINZ 1971



Dekan: Professor Dr. med. A. Mayet
Referent: Professor Dr. rer. nat. Dr. med. G. Thews

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juni 1972

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINE VORAUSSETZUNGEN	
I. Grundlagen der polarographischen O_2 -Druckmessung	
1. Allgemeines Meßprinzip	2
2. Besondere Bedingungen für die Messung des O_2 -Druckes im Gewebe	3
II. Grundlagen der Aktionspotentialregistrierung in Verbindung mit der O_2 - Druckmessung	
1. Meßanordnung für die Registrierung von Aktionspotentialen	4
2. Elektrodeneigenschaften	5
3. Problematik der gleichzeitigen Messung von Aktionsportentialen und O_2 - Druck	7
ENTWICKLUNG DES NEUEN SYSTEMS	
III. Prinzip der Meßanordnung	8
IV. Bauelemente der Meßanordnung	12
V. Aufbau und Wirkungsweise der elektronischen Anordnung für die P_{O_2} - Messung	16
VI. Aufbau und Wirkungsweise der elektronischen Anordnung für die Aktionspotentialregistrierung	19
SIMULTANE MESSUNG VON pO_2 UND AKTIONSPOTENTIALEN	
VII. Gleichzeitige Registrierung des regionalen O_2 -Druckes und der Aktionspotentiale im Hirngewebe der Ratte	23
VIII. Ausblick und Anwendung der neuen Methode	26
ZUSAMMENFASSUNG	27
LITERATUR	

EINLEITUNG

Seit der Entwicklung der O_2 -Mikroelektrodenteknik durch SILVER und CATER (1961) können O_2 -Druckmessungen nach dem polarographischen Meßprinzip im Mikrobereich des Gewebes, insbesondere im Gehirngewebe, durchgeführt werden. Damit ist es möglich, Fragen der O_2 -Mangelversorgung erstmals einer quantitativen Analyse zuzuführen und eine Aussage über die P_{O_2} -Verteilung in kleinsten Abschnitten des Gehirns zu machen.

Untersuchungen am Gehirngewebe, die von zahlreichen Autoren mittels dieser neuen Technik durchgeführt worden sind, haben bereits unter normalen Bedingungen bei Luftatmung der Versuchstiere relativ niedrige Werte für den O_2 -Druck (P_{O_2}) im Gehirngewebe ergeben (LÜBBERS, 1965, LÜBBERS, 1968, HEIDENREICH, ERDMANN, METZGER und THEWS, 1970, u.a.). Es stellte sich uns nun die Frage, ob Gehirngebiete mit relativ niedrigen P_{O_2} -Werten von weniger als 3 mmHg funktionell inaktiv sind bzw. eine verminderte elektrische Aktivität (Aktionspotentialrate) besitzen.

Zur Beantwortung dieser Frage wird eine Einrichtung benötigt, die eine gleichzeitige Ableitung der regionalen P_{O_2} -Werte sowie der Aktionspotentialrate ermöglicht. Um eine Zerstörung der Zellen durch das Elektrodensystem zu verhindern, wird gefordert, daß die verwendeten Platin- oder Gold-Mikroelektroden einen Spitzendurchmesser von größenordnungsmäßig 1 Mikron besitzen und sowohl für die P_{O_2} -Messung als auch für die Aktionspotentialableitung geeignet sein sollen. Mit diesem Ziel wurde ein neues Meßverfahren entwickelt, das die gestellten Forderungen erfüllt. Grundlagen, Prinzip und Durchführung des methodischen Aufbaus sowie die Anwendungsmöglichkeiten des Verfahrens sind Gegenstand der folgenden Darstellung.

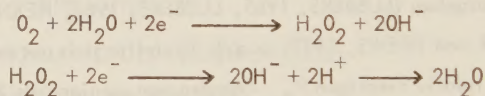
ALLGEMEINE VORAUSSETZUNGEN

I. Grundlagen der polarographischen O_2 -Druckmessung

1. Allgemeines Meßprinzip

Nach dem polarographischen Meßprinzip können Sauerstoffbestimmungen in Elektrolytlösungen und im Blut durchgeführt werden (vgl. GLEICHMANN und LÜBBERS, 1960). Das Meßprinzip ist in der Literatur häufig beschrieben worden und sei zum Verständnis der folgenden Ausführungen kurz skizziert.

Durch Anlegen einer negativen Spannung von 600 - 800 mV an eine Platin- oder Goldelektrode werden die an die Metalloberfläche diffundierenden O_2 -Moleküle durch Anlagerung von zwei Elektronen zu H_2O_2 und durch zwei weitere Elektronen für neutrale und alkalische Lösungen zu Wasser reduziert. Die elektrochemische Reaktion kann etwa folgendermaßen formuliert werden (KOLTHOFF und LINGANE, 1952, u. a.):



Durch die elektrochemische Reaktion wird fortlaufend Sauerstoff verbraucht und durch Diffusion aus dem umgebenden Medium nachgeliefert.

Die Größe des verbrauchten Sauerstoffs ist zunächst einmal von der Größe der Polarisationsspannung abhängig. Bei Erhöhung der an die Platin- oder Goldelektrode angelegten Spannung (s. Abb. 1 a), steigt der Strom zwischen 0 und - 500 mV zunächst proportional zur Spannung an, um zwischen - 600 und - 1200 mV ein mehr oder weniger ausgeprägtes Plateau zu erreichen (Bereich des Diffusionsgrenzstromes). Bei höheren Spannungen kann dann eine lawinenartige Stromzunahme beobachtet werden. Eine derartige Strom - Spannungskurve oder Polarogramm, wie sie für die von uns verwendeten Platin- und Goldelektroden charakteristisch ist, wird in Abb. 1 b dargestellt.

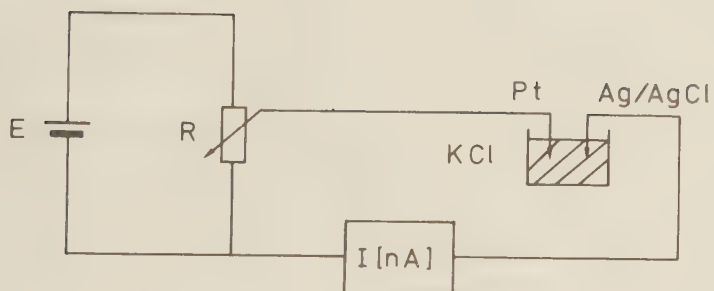


Abb. 1 a: Schaltplan des polarographischen Meßkreises. E stellt eine Batterie dar, an dem Potentiometer R kann die Polarisationsspannung eingestellt werden. I bezeichnet ein hochempfindliches Strommessgerät.

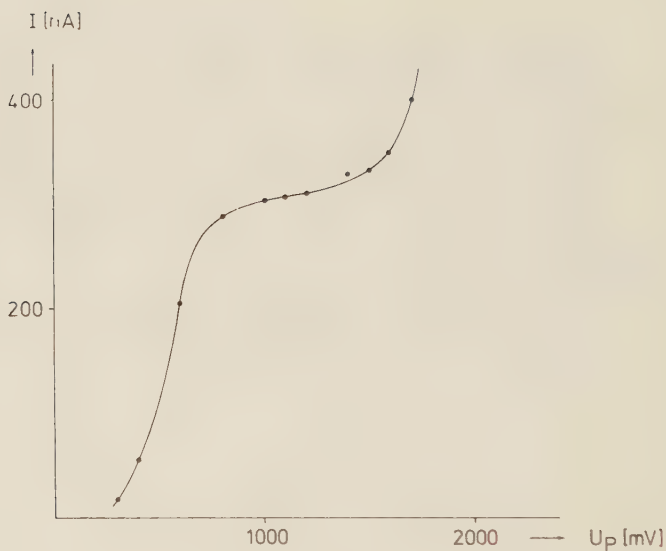


Abb. 1 b: Polarogramm einer Gold - Mikroelektrode. Es ist die Polarisationsspannung U_p in mV gegen den Strom I in nA aufgetragen. Im Bereich zwischen 600 mV und 1200 mV ist ein Plateau zu erkennen.

Bei verschiedenen O_2 -Konzentrationen aufgenommene Polarogramme zeigen eine Variation des Diffusionsgrenzstroms. Entscheidend ist die Tatsache, daß das Plateau im Bereich von - 800 bis 1000 mV erhalten bleibt und zwischen Stromstärke und O_2 -Konzentration, bzw. dem O_2 -Partialdruck eine lineare Beziehung besteht.

Für den praktischen Umgang mit Platinelektroden ist es deshalb wichtig, zunächst den Plateaubereich der betreffenden Elektrode zu finden. Dann stellt man die Polarisierungsspannung auf die Mitte des Plateaubereichs ein und variiert die O_2 -Konzentration.

Die bei konstanter Polarisierungsspannung aufgenommene Stromstärke - O_2 -Konzentrationsbeziehung bildet die Eichkurve der Elektrode, bei deren Kenntnis O_2 -Konzentrationen, bzw. O_2 -Partialdrucke in Lösungen und im Gewebe gemessen werden können.

Das Verhältnis von Polarisierungsspannung und Diffusionsgrenzstrom hat die Dimension eines Widerstandes, man kann deshalb vereinfachend von einem "Elektrodenwiderstand" (R_{EL}) sprechen. Er liegt bei Mikroelektroden von 1 μ Spitzendurchmesser in der Größenordnung von $10^9 \Omega$. Dieser hochohmige Widerstand stellt praktisch den Innenwiderstand der "Stromquelle" dar, deren Intensität von dem jeweiligen O_2 - Partialdruck abhängig ist und bei der polarographischen Messung fortlaufend registriert wird.

2. Besondere Bedingungen für die Messung des O_2 - Druckes im Gewebe

Für P_{O_2} -Messungen im atmenden tierischen Gewebe ist zu fordern, daß die Elektroden so klein sind, daß es zu keinen nennenswerten Zerstörungen der untersuchten biologischen Strukturen kommt. Die Elektroden sollen die Zellmembran durchdringen, ohne die Zellen zu zerstören. Es sind deshalb Spitzendurchmesser von 1 Mikron zu fordern.

Weiterhin soll die Elektrodenoberfläche nicht durch Eiweißablagerungen verändert werden. Diese führen zu artifiziellen Veränderungen der Eichkurve und verfälschen

die Messung. Die Elektrodenspitze muß deshalb mit einer Kunststoffmembran aus Polystyrol, Silikonkautschuk oder Rhoplex überzogen werden. Weiterhin muß von der Meßeinrichtung gefordert werden, daß der für die P_{O_2} -Messung verbrauchte Sauerstoff in dem untersuchten Gewebsbezirk keine nennenswerte örtliche P_{O_2} -Erniedrigung hervorruft, was ebenfalls durch kleine Elektrodendurchmesser zu erreichen ist (FATT, 1964, GRUNEWALD, 1969).

Für die Registrierung schneller P_{O_2} -Änderungen, wie sie bei respiratorischer Hypoxie beobachtet werden (METZGER, ERDMANN, HEIDENREICH und THEWS, 1970), ist außerdem zu fordern, daß die Einstellzeit der Elektrode nicht über einer Sekunde liegt.

Für die vorliegende Untersuchung hat sich die Verwendung von kleinen Goldelektroden mit 1 - 5 μ Spitzendurchmesser als besonders günstig erwiesen. Die neue Elektrode sowie entsprechende Eichvorschriften wurden in unserem Laboratorium parallel zu dieser Arbeit entwickelt und sind an anderer Stelle beschrieben (vgl. KRELL, 1971).

Diese Untersuchung zeigt, daß Überzüge aus Rhoplex für P_{O_2} -Messungen im Gewebe günstig sind, bei stationären Messungen aber dicke Membranen verwendet werden müssen. Nur dann kann eine weitgehende Unabhängigkeit der Elektroden-eichung von dem Gewebsmilieu garantiert werden.

II. Grundlagen der Aktionspotentialregistrierung in Verbindung mit der O_2 -Druckmessung

1. Meßanordnung für die Registrierung von Aktionspotentialen

Das Ableiten von Aktionspotentialen oder anderen leistungsschwachen biologischen Spannungen stellt höchste Anforderungen an das gesamte Meßsystem.

Grundsätzlich kann man das Ableitungssystem in 3 hintereinandergeschaltete Stufen gliedern:

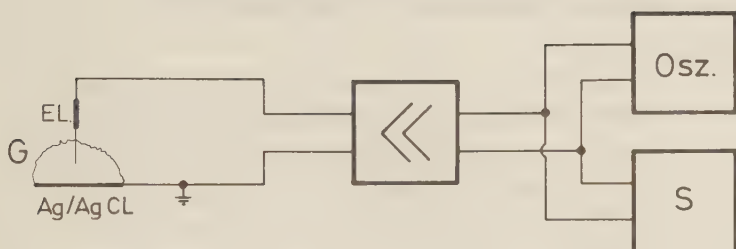


Abb. 2: Blockschaltbild des Systems zur Registrierung von Aktionspotentialen. Die Gegenelektrode Ag/Ag Cl liegt großflächig dem Gewebe G auf. Die differentielle Elektrode EL hat eine sehr kleine Spitze und erfaßt einen punktförmigen Gewebsbereich. Die beiden Elektroden sind mit einem hochohmigen Verstärker verbunden. Dieser Verstärker betreibt einen Oszillografen Osz. und einen schnellen Schreiber S zur Registrierung der Signale.

a) Elektrode, b) Meßverstärker, c) Oszillograph und Registriergerät.
Der prinzipielle Aufbau der Meßanordnung ist in Abb. 2 dargestellt.

2. Elektrodeneigenschaften

Die erste Stufe der Anlage besteht aus der Ableitelektrode mit der Gegenelektrode, die Ableitelektrode ist dabei die differente, die Gegenelektrode die indifferente Elektrode. Die differente Elektrode soll bis auf einen winzigen Teil ihrer feinen Spitze gegen das umgebende Medium gut isoliert sein.

Da bei der Ableitung von Aktionspotentialen nur die Potentialänderung unter der Ableitelektrode registriert werden soll, muß man dafür sorgen, daß das Bezugspotential der Gegenelektrode möglichst konstant bleibt. Dies kann dadurch erreicht werden, daß 1. die Gegenelektrode im Vergleich zur Ableitelektrode sehr groß dimensioniert wird und 2. diese an eine Fläche des Gewebes angelegt wird, an der keine spontanen Spannungsänderungen zu erwarten sind. Geeignete Punkte wären z. B. die Nasenspitze oder das Subcutangewebe des Tieres. Es ist ratsam, die beiden Elektroden möglichst nahe nebeneinander anzuordnen, sofern die Versuchsbedingungen das zulassen, um ein Einstreuen von Potentialänderungen aus anderen Körperbereichen, z. B. der Muskulatur, des Tieres zu vermeiden. Außerdem ist immer zu berücksichtigen, daß am lebenden relaxierten Tier die Potentialdifferenzen des Elektrokardiogramms auch von der Peripherie bzw. dem Kopf des Tieres ableitbar sind. Diese EKG-Einstreuungen können gerade bei hochempfindlichen Messungen sehr stören, sie können aber abgeschwächt bzw. ausgeschaltet werden, wenn man die Lage der Gegenelektrode zur Ableitelektrode so wählt, daß die EKG-Vektoren möglichst gering bzw. gleich Null für diese Ableitrichtung sind. Den günstigsten Punkt für die Lage der Gegenelektrode ermittelt man am schnellsten experimentell. In jedem Fall sollte die Gegenelektrode in unmittelbarer Nachbarschaft zur Elektrode am Kopf des Tieres angelegt werden. Um diese Störeinstreuungen zu unterdrücken ist es weiterhin erforderlich, den Körper des Tieres auf ein hochwertiges Isolationsmaterial zu lagern, z. B. auf eine 5 cm

dicke Styroporplatte, damit der Körper des Tieres keinerlei Verbindung zum Massepotential der Umgebung hat. Sämtliche umliegenden Apparaturen und Halterungen sind nämlich geerdet und somit immer mit dem invertierenden Eingang des ersten Verstärkers verbunden, da bei der gewählten Schaltung ein Pol des Differenzenverstärkereinganges auf Masse liegt. Die Kontaktstelle des Tieres mit der Umgebung (z. B. der herabhängende Schwanz) würde also ebenfalls als Gegenelektrode wirken und einen zweiten Stromkreis schließen, der weder bei der P_{O_2} -Messung noch bei der Aktionspotentialregistrierung wünschenswert wäre.

Selbstverständlich muß das gesamte Meßsystem auch weitgehend gegen von außen kommende Störspannungen gesichert sein. Die Abschirmung des Meßobjektes und des Meßverstärkers durch einen geerdeten Maschendrahtkäfig ist unerlässlich. Aus diesem Grunde müssen auch sämtliche Kabel, die mit der Meßanordnung in Verbindung stehen, sorgfältigst abgeschirmt und geerdet sein.

Die speziellen Eigenschaften der Elektrode werden durch ihren Verwendungszweck bestimmt. Soll z. B. eine Potentialänderung in einem sehr kleinen Gebiet gemessen werden, so muß die freie Spitze der Elektrode ebenfalls sehr klein sein. Bei der simultanen Registrierung von Aktionspotentialen und O_2 -Druck müssen sowohl der durch die Elektrode fließende Gleichstrom als auch die schnell ansteigenden und abfallenden Spannungen (Spikes) der Aktionspotentiale dargestellt werden. Diese Messungen sollen aber nur an einer Nervenzelle oder einem kleinen Nervenzellverband vorgenommen werden. Die freie Elektrodenspitze muß also eine möglichst kleine Oberfläche haben, um punktuell diesen Mikrobereich zu erfassen. Bei den hier verwendeten Elektroden beträgt die freie Oberfläche ungefähr $10 \mu^2$. Die für diese Messungen benutzten Elektroden müssen also folgende Bedingungen erfüllen:

- 1) Der Durchmesser der freien Spitze sollte höchstens $5 - 10 \mu$ betragen
- 2) Der restliche Teil der Elektrode muß möglichst gut gegen das umgebende Gewebe und die Elektrodenhalterung isoliert sein

- 3) Die Kunststoffbespannung muß hinreichend dünn sein, damit der sauerstoffdruckabhängige Gleichstrom und die Wechsellspannungen der Aktionspotentiale registriert werden können.

3. Problematik der gleichzeitigen Messung von Aktionspotentialen und O_2 -Druck

Das grundlegende Problem der gleichzeitigen Aktionspotential- und P_{O_2} -Messung liegt in der Vereinigung von zwei extrem entgegengesetzten Forderungen. Die Aktionspotential - Messung ist nämlich eine Spannungsmessung, die stromlos erfolgen sollte, während die P_{O_2} -Messung auf einer Strommessung beruht. Um die stromlose Aktionspotential - Messung durchzuführen, müßte der Meßverstärker also einen extrem hohen Eingangswiderstand haben, die Strommessung hingegen ist aber nur bei einem extrem kleinen Eingangswiderstand des Meßgerätes möglich. Einen Kompromiß aus diesen beiden Forderungen zu schließen, ist nur in unbefriedigender Weise möglich.

Es würde nämlich in erster Linie (vgl. Kap. III) keine konstante Polarisationsspannung zu erreichen sein und außerdem die Aktionspotentialregistrierung durch Ohm'sche Widerstände belastet.

Abb. 3 zeigt eine Schaltung, die einen Kompromiß aus beiden Forderungen darstellt. Man sieht, daß sich die Polarisationsspannung über R_V und R_{EL} teilt und andererseits der Eingang des Meßverstärkers mit dem Widerstand R_V überbrückt ist. Von dem ursprünglichen Aktionspotential würde nur der Teil, der an R_V abfällt, am Verstärkereingang zur Verfügung stehen. Außerdem würden die Aktionspotentiale und langsamere Spannungsänderungen, die in diesem relativ hochohmigen Kreis auftreten, auch als Stromänderungen (vgl. Kap. V) von dem Nano-Amperemeter angezeigt werden. Aktionspotentiale und störende Potentiale verschiedenster Herkunft wären also der P_{O_2} - Anzeige "aufmoduliert".

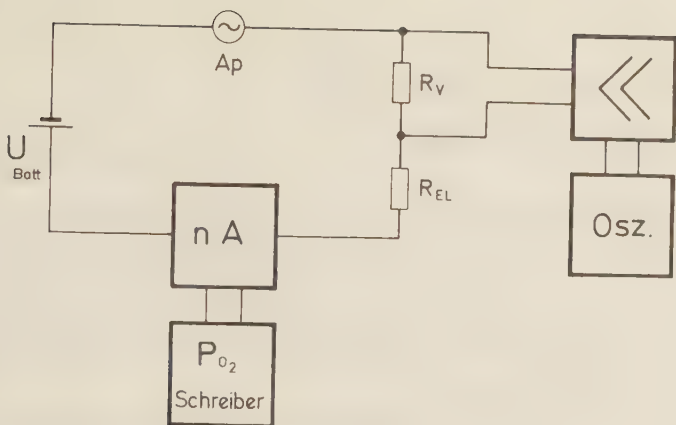


Abb. 3: Schaltungsmöglichkeit eines Systems für simultane pO_2 und Aktionspotentialregistrierung. $U_{Batt.}$ ist die Polarisationsspannung. Ap symbolisiert ein Wechsellspannungssignal (Aktionspotential). R_v ist ein hochohmiger Widerstand, der dem Elektrodenwiderstand R_{EL} vorgeschaltet ist. Der hochohmige Verstärker und der Oszillograf ($Osz.$) sind parallel zu R_v geschaltet. Ein empfindliches Strommessgerät (nA) und Schreiber registrieren den pO_2 - abhängigen Gleichstrom dieses Kreises.

ENTWICKLUNG DES NEUEN SYSTEMS

III. Prinzip der Meßanordnung

Bei der Entwicklung des Verfahrens zur gleichzeitigen Registrierung von Aktionspotential- und P_{O_2} -Werten wurden drei Gesichtspunkte besonders berücksichtigt:

- a) Bei der P_{O_2} -Messung muß die Elektrodenspannung auch bei großen Veränderungen des Elektrodenwiderstandes konstant bleiben und darf von anderen Potentialen nicht überlagert werden.
- b) Bei der Aktionspotentialregistrierung darf das Meßobjekt leistungsmäßig möglichst nur wenig belastet werden, d. h., der Eingangswiderstand des Meßgerätes sollte für die Aktionspotential - Ableitung möglichst hoch sein.
- c) Da beide Meßgrößen gleichzeitig mittels derselben Elektrode und Gegenelektrode aufgenommen werden, müssen die beiden Größen elektronisch voneinander getrennt werden. Am Ausgang des Gerätes sollten beide Meßgrößen so erscheinen, als sei jede einzeln abgeleitet worden, d. h., die beiden Meßkanäle dürfen sich gegenseitig nicht beeinflussen.

Um diese Forderungen zu erfüllen, wurde folgender Weg beschritten:

In den herkömmlichen Strommeßkreis wurde ein hochohmiger Widerstand in Serie eingeschaltet, nur so wird nämlich das Zusammenbrechen der Aktionspotentiale in dem Meßkreis verhindert. Dieser hochohmige Widerstand, der der Elektrode vorgeschaltet ist, bewirkt jedoch eine Spannungsteilung der Polarisationsspannung. An der Elektrode würde also nur noch eine Teilspannung anliegen. Diese Teilspannung ist gegeben durch das Verhältnis R_v/R_{EL} (vgl. Abb. 4). Die an R_{EL} anliegende Polarisationsspannung würde sich also als Funktion des im Meßkreis fließenden Stromes ändern.

Um dieses zu verhindern wurde ein Regelkreis entwickelt, der die Konstanz der Elektrodenspannung garantiert. Hierbei wird die Polarisationsspannung der Elektrode nicht aus einer Batterie entnommen, sondern durch die Ausgangsspannung eines Rechenverstärkers geliefert. Der Spannungsabfall über dem Elektrodenwiderstand

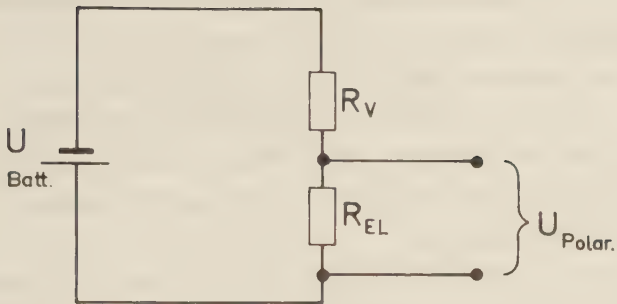


Abb. 4: Die Gleichspannung $U_{\text{Batt.}}$ teilt sich über R_V und R_{EL} . Die an R_{EL} anliegende Polarisationsspannung ist sowohl von R_V als auch von R_{EL} abhängig (Ohm'sches Gesetz).

wird ständig hochohmig gemessen und mit einem vorgegebenen Sollwert verglichen (Abb. 5). Die Ausgangsspannung dieser Sollwert-Istwert-Vergleichsstufe ist immer proportional der Differenz zwischen Sollwert und Istwert.

Mit dieser Spannung wird nun ein weiterer Rechenverstärker angesteuert, der in dem Regelkreis als Stellglied wirkt und dessen Ausgangsspannung über den Vorschaltwiderstand R_v die Polarisationspannung der Elektrode aufrecht erhält. Die an der Elektrode anliegende Spannung ist also eine Teilspannung der Ausgangsspannung des Rechenverstärkers OA 2.

Verkleinert sich nun der Elektrodenwiderstand durch einen höheren P_{O_2} , so müßte die Teilspannung an R_{EL} nach dem Ohm'schen Gesetz sinken, da sich die Spannung an der Elektrode als

$$U_{EL} = U_A \cdot \frac{R_{EL}}{R_{EL} + R_v}$$

ergibt.

Dieser Effekt wird aber sofort durch die nun einsetzende Regulation fast vollständig aufgehoben. Ein Absinken der gegen Masse negativen Spannung an der Elektrode bewirkt nämlich eine Vergrößerung des Sollwert-Istwert-Abstandes. Dadurch wird die Eingangsspannungsdifferenz am Rechenverstärker OA 1 (vgl. Abb. 5) höher, und folglich steigt auch die Ausgangsspannung dieses Differenzenverstärkers, die wiederum das Stellglied stärker betätigt. Daraus resultiert eine höhere Ausgangsspannung des Verstärkers OA 2 und somit wird auch die Teilspannung an R_{EL} größer. Das heißt, das ursprüngliche Absinken der Elektrodenspannung wurde kompensiert. Natürlich kann die geregelte Elektrodenspannung nie genau den Sollwert erreichen, da sonst keine Regelabweichung mehr vorhanden wäre und die Verstärker keine Eingangsspannungsdifferenzen mehr zur Aufrechterhaltung des neuen Gleichgewichtes hätten.

Der Regelkreis stellt also einen pT_2 -Regler dar, bei dem die am Potentiometer P vorgegebene Spannung als Führungsgröße dient und von dem Istwert (= momentane

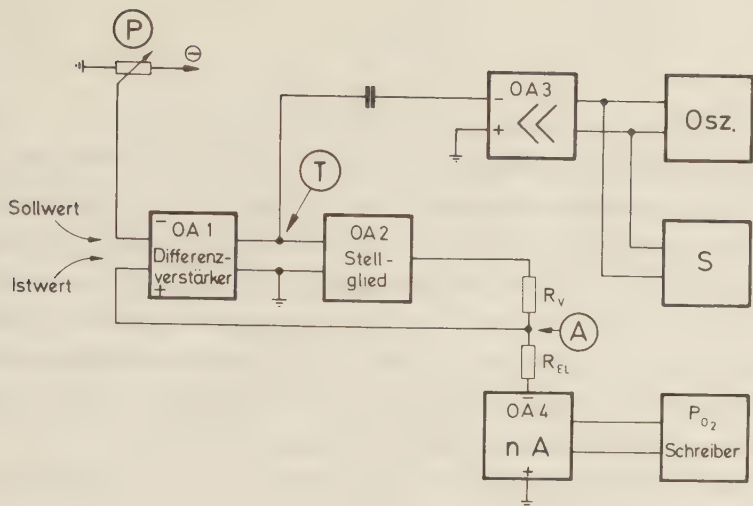


Abb. 5: Blockschaltbild des gesamten Systems. Der Elektrodenstrecke (R_{EL}) wurde ein hochohmiger Widerstand (R_V) vorgeschaltet. Die am Punkt A gegen Masse anliegende Spannung wird von OA 1 hochohmig gemessen (Feldeffekttransistoreingang) und als Istwert mit dem durch das Potentiometer P vorgegebenen Sollwert verglichen. Die Ausgangsspannung von OA 1 ist proportional der Differenz von Sollwert und Istwert. OA 2 ist ein Gleichspannungsverstärker in invertierender Schaltung. Die Ausgangsspannung von OA 2 (max. 11 V) hält über R_V die Polarisierungsspannung konstant. Der Regelkreis für die Polarisierungsspannung ist damit geschlossen. In Serienschaltung zur Elektrodenstrecke befindet sich ein Stromverstärker, der den pO_2 - abhängigen Gleichstrom über den Schreiber zur Anzeige bringt. Da OA 1 sowohl Gleich- als auch Wechselspannungen verstärkt, wurden die Wechselspannungen am Punkt A hochohmig abgeleitet und können am Punkt T kapazitiv ausgekoppelt werden. Durch OA 3 wird eine Nachverstärkung und eine Linearisierung des Frequenzverlaufs (von 100 Hz bis 10 k Hz) erreicht. An OA 3 ist ein Oszillograf und ein schneller Schreiber zur Sichtbarmachung der abgeleiteten Wechselspannungssignale (Aktionspotentiale) angeschlossen.

Elektrodenspannung) nur näherungsweise erreicht wird. Durch den hohen Verstärkungsfaktor beträgt die Regelabweichung aber nur maximal 5 % des Sollwertes, so daß sich die Polarisationsspannung an der Elektrode während der P_{O_2} -Messung um nur höchstens 5 % ändern kann. In der Praxis wird jedoch nie der gesamte Regelbereich angesteuert, so daß sich die Elektrodenspannung während der Messung nur um 1 bis 2 % verschiebt. Diese Verschiebung ist so gering, daß sie vernachlässigt werden kann. Es handelt sich dabei um einen wesentlichen Teil der Gesamtanordnung, der die Genauigkeit der P_{O_2} -Messung garantiert.

An Hand der Abbildung 5 soll das Prinzip der Anordnung nochmals erläutert werden: Man sieht, daß durch den hochohmigen Vorschaltwiderstand R_v Wechselspannungen, die im Gewebe entstehen, nicht über den Elektrodenwiderstand abfallen und in nahezu voller Größe am Punkt A gegen Masse erscheinen. Der Wechselstromwiderstand der Elektrode ist nämlich durch kapazitive Eigenschaften der Elektrode wesentlich geringer als der Ohm'sche Widerstand R_v .

Diese kleinen Spannungsänderungen am Punkt A, die durch die elektrische Aktivität der Nervenzellverbände unter der Elektrode hervorgerufen wurden, gelangen über die "Meßleitung" an den +Eingang des Rechenverstärkers 1. Da das Potential am -Eingang durch die Stellung des Potentiometers fixiert ist, erscheint am Punkt P das über die "Meßleitung" abgeleitete Aktionspotential um den Faktor 5 verstärkt. Der Verstärker 1 ist nämlich auf 5-fache Verstärkung eingestellt. Der Verstärker OA 1 wirkt aber außerdem hauptsächlich als Impedanzwandler, da der +Eingang extrem hochohmig ($10^{11} \Omega$) ist, während der Ausgang mit 1000Ω niederohmig ist.

An dem Punkt T sind sowohl Gleich- als auch Wechselspannungsdifferenzen, in gleichem Maße verstärkt, niederohmig abgreifbar. Hier trennen sich nun die Wege für die P_{O_2} -Messung und die Aktionspotentialregistrierung. Der Verstärker OA 2 wirkt nämlich durch einen großen Kondensator im Gegenkopplungsweig nur als Verstärker für Gleichspannungen, bzw. für Wechselspannungen bis zu Frequenzen von einigen Hz. Die Aktionspotentiale, die eine hohe Anstiegssteilheit haben, werden hier nicht mit-

verstärkt und nehmen somit an der Regelung im Elektrodenkreis nicht teil. Sie werden vielmehr über den Kondensator C am Punkt T abgegriffen und in dem Verstärker OA 3 nachverstärkt. Sie stehen dann am Ausgang des Verstärkers OA 3, insgesamt 500-fach verstärkt, zum Anschluß des Oszillographen zur Verfügung. Der Rechenverstärker OA 4 ist als hochempfindliches Ampèremeter ausgelegt und wird im Elektrodenkreis zur Messung des vom P_{O_2} abhängigen Gleichstromes benutzt (vgl. Gesamtschaltbild Abb. 11a und Kap. V). Der Strom im Elektrodenkreis fließt über die Gegenelektrode und die Ampèremeterschaltung zur Masse, die den positiven Pol der Polarisationsspannung darstellt. Der als Ampèremeter verschaltete Verstärker OA 4 erzeugt keinen zusätzlichen Spannungsabfall. Die von dem Verstärker OA 4 gelieferte Ausgangsspannung ist proportional dem im Elektrodenkreis fließenden Gleichstrom und somit ein Maß für den P_{O_2} . An diesen Verstärkerausgang wird der Schreiber für P_{O_2} angeschlossen. Diese Messung verläuft völlig störungsfrei, da man den Regelkreis für die P_{O_2} -Messung als stabilisierte Polarisationsspannungsquelle betrachten kann.

IV. Bauelemente der Meßanordnung

Bei der Konstruktion der Schaltung wurden neben herkömmlichen Bauelementen moderne integrierte Verstärkereinheiten verwendet. Die speziellen Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten dieser sogenannten Rechenverstärker seien hier zum besseren Verständnis der im folgenden beschriebenen Gesamtanordnung dargelegt.

Ein Rechenverstärker besteht in der Regel aus miniaturisierten Halbleitern und Bauelementen. Diese Miniaturbauteile können nun so verschaltet werden, daß ein hochwertiger Verstärker resultiert. Das gesamte Schaltungssystem ist in Kunststoff eingegossen oder in kleinen Metallkapseln (von der Größe eines herkömmlichen Transistors) untergebracht. Man erhält also eine Miniatureinheit, deren Eigenschaften durch einfache äußere Schaltelemente an die Erfordernisse der speziellen Anwendung angepaßt werden können. Dadurch wird es möglich, komplizierte Schaltungen schnell und störungsfrei aufzubauen, da die vorgefertigten Verstärkereinheiten stabilisiert und standardisiert sind. Die hier verwendeten Rechenverstärker enthalten neben anderen Schaltungselementen je 8 - 10 Transistoren, davon 2 Feldeffekttransistoren in der Eingangsstufe, die für den hohen Eingangswiderstand ($10^{11} \Omega$) des Rechenverstärkers verantwortlich sind. Der Verstärker reagiert bei angesteuertem E- Eingang mit einer zur Eingangsspannung negativen Ausgangsspannung, am F+ Eingang dagegen mit einer positiven. Es handelt sich bei den Rechenverstärkern also um Differenzverstärker (vgl. Abb. 6).

Die Ausgangsspannung kann sowohl positive als auch negative Werte annehmen, da die Verstärker auch mit positiven und negativen Betriebsspannungen versorgt werden. Normalerweise werden die Rechenverstärker mit + 15 V gegen Masse und mit -15 V gegen Masse betrieben. Dabei können die Verstärker so ausgesteuert werden, daß die Ausgangsspannung (gegen Masse) zwischen -10 V und + 10 V liegt. Der Verstärker darf also immer nur so ausgesteuert werden, daß der Betrag der Ausgangsspannung maximal 10 V erreicht. Wird dieser Wert überschritten, so ist der Verstärker "blockiert", d. h. unfähig, die Signale zu übertragen. Es muß in jedem Fall auf die richtige Polung und Höhe der beiden Versorgungsspannungen

geachtet werden. Sehr gefährlich für den Rechenverstärker können statische Ladungen werden, die an den Verstärkereingang gelangen; solche statischen Ladungen können schon durch Anfassen des Rechenverstärkers in ungünstigen Fällen dessen Eingangsstufe zerstören, da statische Ladungen hohe Potentialdifferenzen (Kilovoltbereich) mit sich bringen. Man sollte daher beim Arbeiten am ausgeschalteten Gerät die Eingänge des Verstärkers kurzschließen und erden. Die hier verwendeten Rechenverstärker haben in unverschaltetem Zustand eine sogenannte Leerlaufverstärkung von 10^5 , d. h. es genügen 100 μV Eingangsspannung, um den Verstärker vollständig (10 V Ausgangsspannung) auszusteuern.

Die Arbeitsweise der Verstärkeranordnung wird durch Abb. 7 erläutert. Es ist in der Zeichnung eine Eingangsspannung U_E von 1V eingezeichnet, der Gegenkopplungswiderstand R_2 sei 10mal höher als R_1 . Durch die positive Eingangsspannung wird nun der Verstärker durch seinen hohen Verstärkungsgrad bis in die Begrenzung von 10 V angesteuert. Da bei Ansteuerung des invertierenden Eingangs eine zur Eingangsspannung negative Ausgangsspannung entsteht, erhält man am Ausgang -10 V. Aus der Zeichnung erkennt man, daß für die Bedingung $R_2 = 10 \cdot R_1$ an P 0 Volt gegen Masse entsteht, wenn an Punkt A +1 V und an Punkt B -10 V anliegen. Natürlich können an P nicht vollständig null V anliegen, die Ausgangsspannung wäre ja dann auch null V und nicht -10 V. Es muß sich also (für eine Leerlaufverstärkung von 10^5) an Punkt P eine Spannung gegen Masse von 100 μV einstellen. Diese Spannung ist aber im Vergleich zu allen anderen Spannungen so gering, daß man sie praktisch als Null betrachten kann. Der Punkt hat also immer nahezu Massepotential ohne direkt mit Masse verbunden zu sein. Man spricht deshalb von einer "virtuellen Masse".

Man sieht also, daß für $R_2 = 10 \cdot R_1$ und +1 V Eingangsspannung eine Ausgangsspannung von -10 V resultiert, wenn man die äußerst geringe Spannung an P vernachlässigt. Der Verstärkungsfaktor dieser typischen Rechenverstärkerschaltung betrug also 10.

Es gilt die Beziehung

$$U_A = -U_E \cdot \frac{R_2}{R_1}$$

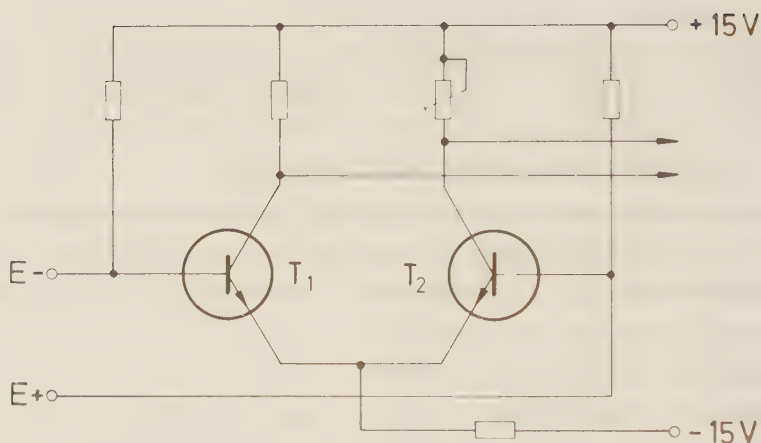


Abb. 6: Typische Eingangsstufe eines Operationsverstärkers. T_1 und T_2 sind die Eingangstransistoren, die beiden Pfeile kennzeichnen die Anschlußpunkte der folgenden Stufen.

Der Widerstand R_1 ist dabei gleich dem Eingangswiderstand der Schaltung, da der Punkt P virtuell auf Masse liegt. Der Verstärkungsfaktor wird durch das Verhältnis $\frac{R_2}{R_1}$ angegeben, bei höheren Frequenzen kann dieses Verhältnis aber, bedingt durch die Charakteristik der inneren Verschaltung des Verstärkers, nicht mehr eingehalten werden.

Abb. 8 zeigt die Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Frequenz. Man sieht, daß die hier verwendeten Rechenverstärker (Philbrick - Nexus, Modell 1009) bei einem eingestellten Verstärkungsfaktor von beispielsweise 100 bis zu ca. 20 KHz linear arbeiten. Höhere Verstärkungen bringen also geringere Bandbreiten mit sich.

Die oben beschriebene Schaltung wurde in dem Gerät zur gleichzeitigen P_{02} und Aktionspotentialsregistrierung zweimal verwendet und zwar bei dem zweiten und dritten Verstärker. Abb. 9 zeigt eine ähnliche Schaltung wie Abb. 7. Hier wurde nur der Widerstand R_1 weggelassen. Bei dieser Schaltung ist R_1 also praktisch als Null einzusetzen, der Strom I fließt nahezu vollständig über den Widerstand R_2 , weil der Strom, der durch den Verstärkereingang fließt, wegen dessen hohem Eingangswiderstand zu vernachlässigen ist. Wie oben dargestellt, liegt bei den Rechenverstärkern der invertierende Eingang virtuell auf Masse, so daß in Abb. 9 die Ausgangsspannung gleich der an dem Widerstand R_2 anliegenden Spannung sein muß.

Da der Strom im Eingangskreis in nahezu voller Größe durch R_2 fließt, gilt hierfür

$$U_A = -I \cdot R_2$$

Es handelt sich also um einen Strom-Spannungsumsetzer, da die Ausgangsspannung dem Strom im Eingangskreis proportional ist. Der Spannungsabfall am Eingang dieses hochwertigen Strommeßkreises beträgt nur maximal 100 μV (bei Vollaussteuerung von 10 V, s. oben). Diese Art der Verschaltung wurde bei dem Rechenverstärker OA 4 verwendet, der den P_{02} -abhängigen Strom im Elektrodenkreis in eine belastbare stromproportionale Spannung umsetzt.

Weiterhin wurde in dem Aktionspotential- P_{02} -Gerät die Schaltung des Elektrometerverstärkers benutzt. Diese Schaltung wurde in erster Linie als Impedanzwandler verwendet. Wie man aus Abb. 10 erkennt, wird hierbei der +Eingang direkt angesteuert, was für den

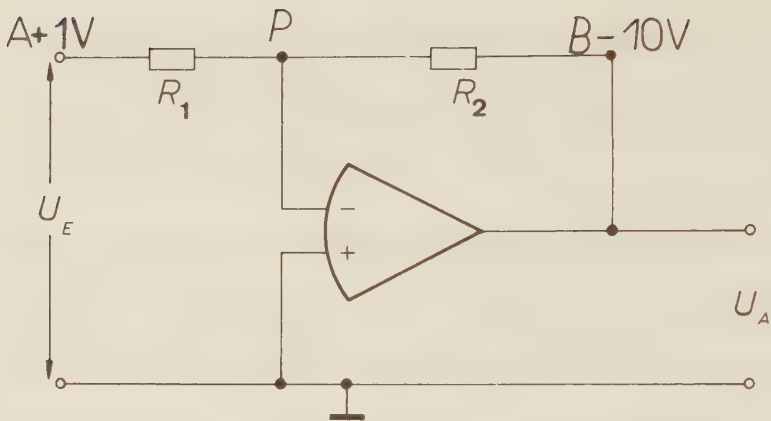


Abb. 7: Grundsaltung des Operationsverstärkers. Der + Eingang des Verstärkers liegt auf Massepotential, der -Eingang wird über R_1 / R_2 angesteuert. Punkt P hat wegen der hohen Verstärkung nahezu Massepotential und kann daher als virtuelle Masse bezeichnet werden. Die Ausgangsspannung ist immer negativ zur Eingangsspannung. Man spricht bei dieser Schaltung daher von einem invertierenden Verstärker. Die Ausgangsspannung U_A ist gleich

$$U_A = -\frac{R_2}{R_1} \cdot U_E$$

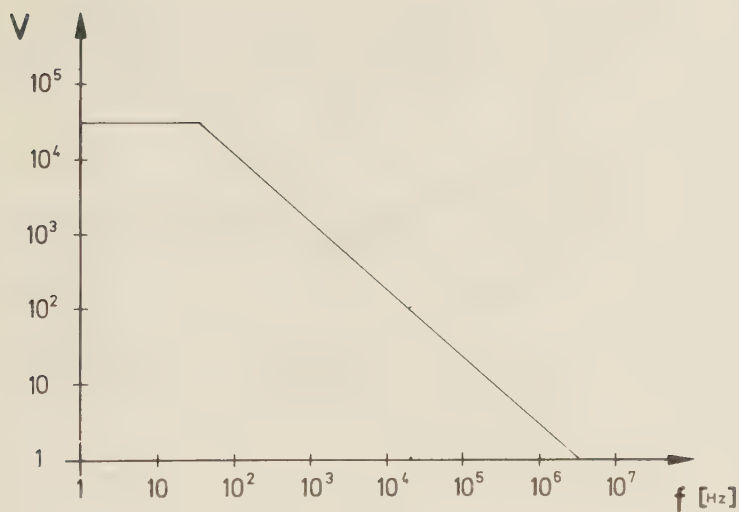


Abb. 8: Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Frequenz (für den Operationsverstärker Philbrick - Nexus 1009). Höhere Verstärkungsfaktoren bringen geringere Bandbreiten mit sich. Der Verlauf dieses Diagramms ist für jeden Operationsverstärker charakteristisch.

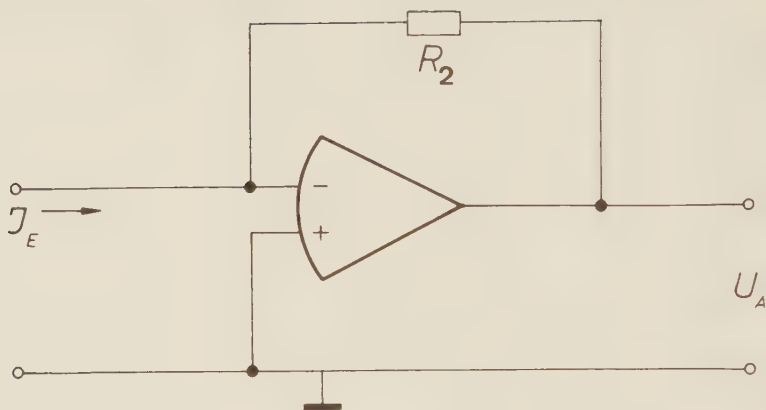


Abb. 9: Schaltung des Operationsverstärkers als hochwertiges Ampèremeter.

Durch den geringen Stromfluß im Eingangskreis des Operationsverstärkers, fließt I_E nahezu vollständig über R_2 . Der invertierende Eingang (E) des Rechenverstärkers liegt virtuell auf Masse, daher fällt die Ausgangsspannung U_A in voller Größe auch an R_2 ab. Nachdem Ohm'schen Gesetz gilt demnach:

$$U_A = -I_E \cdot R_2$$

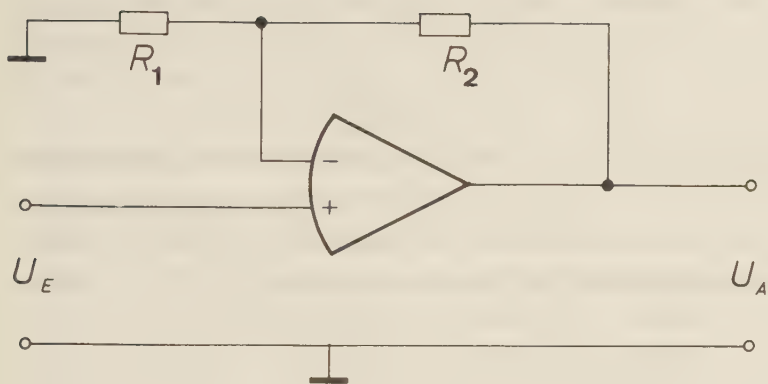


Abb. 10: Schaltung des Operationsverstärkers als Elektrometerverstärker.

Diese Schaltung eignet sich besonders für empfindliche und hochohmige Messungen, da der nicht invertierende Eingang direkt angesteuert wird. Der über den Eingang fließende Strom I_E ist nahezu gleich null, das heißt, die Messung ist extrem belastungsarm. Die Beziehung zwischen Ausgangsspannung U_A und Eingangsspannung U_E ist gegeben durch:

$$U_A = \left(1 + \frac{R_2}{R_1} \right) \cdot U_E$$

sehr hohen Eingangswiderstand dieser Schaltung ($10^{11} \Omega$) verantwortlich ist. Die Abhängigkeit der Ausgangsspannung von der Eingangsspannung ist gegeben durch

$$U_A = \left(1 + \frac{R_2}{R_1} \right) \cdot U_E$$

Man sollte jedoch bei dieser Schaltung den Verstärkungsfaktor nicht zu hoch einstellen, da diese Schaltung sonst zur Instabilität neigt. Die Kapazität des hochohmigen Eingangs (15 pF) kann sich nämlich aufladen, so daß bei einem extrem hochohmigen Spannungsmesskreis der Verstärker leicht in die Vollaussteuerung gerät.

V. Aufbau und Wirkungsweise der elektronischen Anordnung für die P_{O_2} - Messung

Nachdem im vorhergehenden Kapitel die einzelnen Funktionselemente beschrieben worden sind, kann die Wirkungsweise der gesamten Schaltung erläutert werden. Zunächst sei das Verhalten des Systems bei der Gleichstrommessung für die P_{O_2} - Aufnahme dargestellt (vgl. Abb. 11 a).

Wie man aus Kapitel III ersehen kann, handelt es sich bei dem ersten Rechenverstärker um eine Elektrometerschaltung, die gemäß dem Widerstandsverhältnis $R_4 : R_3$ eine ca. 5fache Verstärkung aufweist. Der Widerstand R_3 wurde aber nicht (wie sonst üblich) mit Masse verbunden, sondern über den Spannungsteiler R_1/R_2 auf ein negatives Potential gelegt, das an R_1 im Bereich von 0 bis 1,2 V einstellbar ist. Liegt nämlich der Schleifer des Potentiometers am Anschlag der Masseseite, so ist die Führungsgröße gleich Null und sämtliche Spannungen im Regelkreis sind gleich Null. Auch an der Elektrode würde dann keine Spannung anliegen. Wird das Potentiometer R_1 auf einen bestimmten Wert eingestellt, so folgt die an den +Eingang herangeführte Elektrodenspannung diesem gewählten Wert bis jeweils auf $\frac{4}{500}$ der Ausgangsspannung des zweiten Rechenverstärkers, da der zweite Rechenverstärker durch R_7/R_6 auf 100-fache Verstärkung eingestellt ist. D. h. Verstärker OA 1 und OA 2 haben insgesamt einen Verstärkungsfaktor von 500. Es sei aber darauf hingewiesen, daß der Verstärkungsfaktor nur für Gleichspannungen diesen Wert hat.

Der Widerstand R_2 dient erstens zur Bereicheinstellung des Potentiometers R_1 und zweitens als Schutzwiderstand zur Vermeidung zu hoher Potentiale am -Eingang (max. 5 V).

Das Potentiometer R_1 ist mit 500Ω relativ klein im Verhältnis zu R_3 mit $10 K \Omega$. Das ist nötig, da sich sonst der Verstärkungsfaktor dieser ersten Stufe in Abhängigkeit von der Stellung des Schleifers verändern würde.

Der Widerstand R_7 ist mit einer hohen Kapazität überbrückt, für Wechselspannungen stellt dieser Kondensator einen mit steigender Frequenz kleiner werdenden Widerstand dar. Der Verstärkungsfaktor dieser Stufe ist also nur für Gleichspannungen

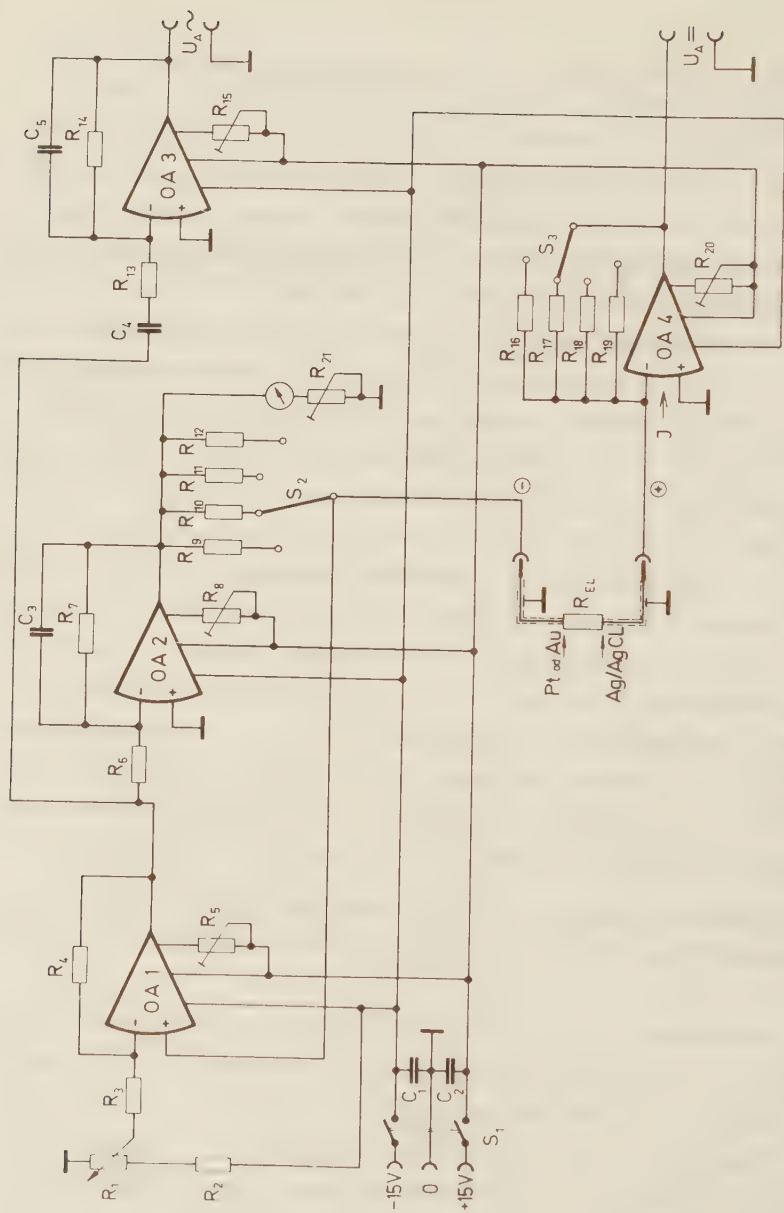


Abb. 11 a: Gesamtschaltbild des elektronischen Systems.

OA 1 ist als Elektrometerverstärker (Verstärkungsfaktor 5) geschaltet. OA 2 arbeitet als invertierender Gleichspannungsverstärker (Stellglied, vgl. Abb. 5).

OA 3 ist als selektiver Wechselspannungsverstärker verschaltet. Die Elemente C_4 / R_{13} und C_5 / R_{14} sind so dimensioniert, daß eine annähernd lineare Verstärkung des gesamten Systems – einschließlich Elektrode – von 100 Hz bis 10 k Hz resultiert.

Der Rechenverstärker OA 4 ist als empfindliches Ampèremeter verschaltet. R_{EL} symbolisiert die Strecke zwischen Elektrode und Gegenelektrode (vgl. Abb. 3).

Spezifikation zum Gesamtschaltbild

Widerstände und Trimpotentiometer 1/4 W, 5 % Toleranz

R [Ω]	1	500			
	2	4,7 K			
	3	10 K			
	4	50 K	C	1	100 μ f
	5	1 K		2	100 μ f
	6	10 K		3	100 n f
	7	1 M		4	220 n f
	8	1 K		5	8 p f
	9	10 M			
	10	100 M			
	11	680 M			
	12	1 G			
	13	10 K			
	14	1,2 M			
	15	1 K			
	16	10 M			
	17	80 M			
	18	680 M			
	19	1 G			
	20	1 K			
	21	100 K			

Das Meßinstrument am Ausgang von OA 2 stellt ein 100 μ A - Meßwerk dar, das durch R₂₁ auf 15 V Vollausschlag eingestellt wird.

Die Operationsverstärker OA 1 bis OA 4 sind die Modelle 1009 02 der Firma Philbrick / Nexus

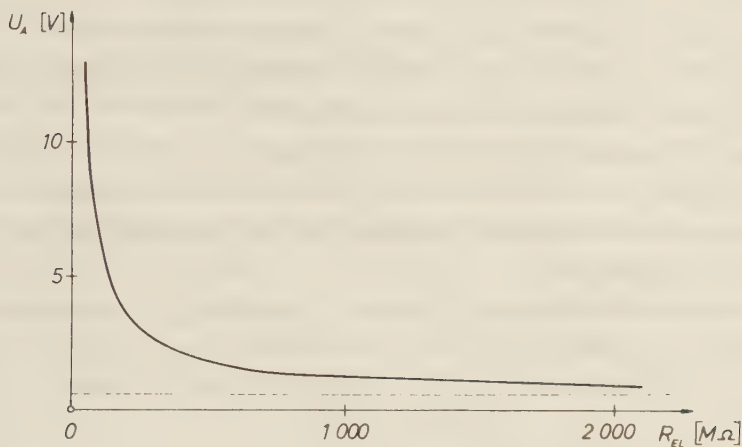


Abb. 11 b: Abhängigkeit der Ausgangsspannung U_A von OA 2 von dem "Elektrodenwiderstand" R_{EL} . Das Diagramm gilt für einen Vorschaltwiderstand R_V von $1\text{ G}\Omega$. Bei hohen R_{EL} nähert sich U_A asymptotisch der eingestellten Polarisationsspannung (gestrichelte Linie). Bei kleinerem R_{EL} ($\approx 100\text{ M}\Omega$) gerät OA 2 leicht in die Vollaussteuerung von 11 V. Das Meßinstrument am Ausgang von OA 2 zeigt diese eventuelle Übersteuerung an. Durch Wahl eines niedrigeren Vorschaltwiderstandes (durch S_2) kann für jede Elektrode der richtige Bereich eingestellt werden.

gleich 100. Für Wechselspannungen ist er dagegen sehr niedrig.

Die Trimpotentiometer R_5 und R_8 dienen zur Kompensation der internen Asymmetrien der Verstärker. Sie werden bei kurzgeschlossenem Eingang so eingestellt, daß am Ausgang keine Spannung vorhanden ist.

Durch den Stufenschalter S_2 können die Widerstände R_9 , R_{10} , R_{11} und R_{12} in den Elektrodenkreis eingeschaltet werden. Über den jeweils der Elektrode vorgeschalteten Widerstand findet die Spannungsteilung der Ausgangsspannung des zweiten Verstärkers statt.

Die Summe der Teilspannung an R_{10} (s. Abb.11 a) und an R_{EL} ist gleich der Ausgangsspannung von OA 2.

$$U_A = U_{R_{10}} + U_{R_{EL}}$$

Nach dem Ohmschen Gesetz gilt weiterhin

$$\frac{U_{R_{10}}}{U_{REL}} = \frac{R_{10}}{R_{EL}}$$

Setzt man dieses Verhältnis oben ein, so erhält man eine Beziehung zwischen Ausgangsspannung und R_{EL} :

$$U_A = U_{REL} \cdot \frac{R_{10}}{R_{EL}} + U_{REL}$$

Dabei wird U_{EL} durch die Regelung konstant gehalten, R_{10} ist in dieser Formel auch als Konstante anzusehen, so daß man hier eine Abhängigkeit der Ausgangsspannung vom Elektrodenwiderstand hat. Man könnte die Höhe dieser Ausgangsspannung also auch zur Messung des P_{02} heranziehen, es ergibt sich dann jedoch eine nichtlineare Anzeige (vergleiche Abb.11b), was eine schlechte Ablesung bei hohen Elektrodenwiderständen (d. h. bei kleinen P_{02} -Werten) mit sich bringt.

Außerdem wäre diese Messung ungenau, da durch die Ausgangsspannung am Verstärker OA 2 auch gleichzeitig störende Gleichspannungen und langsame Potentialänderungen im Elektrodenkreis ausreguliert werden. Je höher der der Elektrode vorgeschaltete Widerstand ist, um so höher muß die Ausgangsspannung am Verstärker OA 2 werden, um die konstante Spannung an der Elektrode aufrechtzuhalten. Bei hohen Vorschaltwiderständen könnte der Verstärker OA 2 also leicht an seine Aussteuerungsgrenze von 11 V geraten. Deswegen wurde ein Voltmeter eingebaut, R_{21} dient dabei zur Bereichseinstellung des Meßwerkes. Mit dem Schalter S_2 kann dann ein Vorschaltwiderstand gewählt werden, der bei dem jeweils zu erwartenden kleinsten Elektrodenwiderstand den Verstärker OA 2 nicht übersteuern läßt.

Da die Ausgangsspannung des Verstärkers OA 2 negativ ist, bildet das Massepotential des Gerätes den positiven Pol der Polarisationsspannung. Der Strom, der durch die Elektrode fließt, gelangt nicht direkt zu diesem positiven Pol, sondern muß noch die Ampèremeterschaltung des Rechenverstärkers OA 4 durchfließen. Dadurch wird (s. oben) ein Spannungsabfall über den Ampèremetereingang von höchstens 100 μ V erzeugt. Dieser Abfall ist so gering, daß er ohne weiteres vernachlässigt werden kann.

Die Widerstände R_{16} , R_{17} , R_{18} und R_{19} dienen zur Empfindlichkeitseinstellung des Ampèremeters, da sich die Ausgangsspannung als $U_A = -J \cdot R_{17}$ (oder R_{16} , R_{18} , R_{19} , je nach Schalterstellung) ergibt. R_{20} dient wiederum zur internen Nullpunkt Korrektur des Rechenverstärkers.

VI. Aufbau und Wirkungsweise der elektronischen Anordnung für die Aktionspotentialregistrierung

Im polarographischen Meßsystem kann der Elektrodenwiderstand größenordnungsmäßig m 100 M Ω bis 1 000 M Ω angegeben werden. Der auftretende Strom bewegt sich in der Größenordnung von 10^{-9} A, weil der Strom ausschließlich durch die Reduktion der durch die Kunststoffmembran hindurchdiffundierten O_2 - Moleküle an der Metalloberfläche der Elektrode zustande kommt.

Ganz anders verhält sich die Elektrode für Wechselspannungsverhältnisse. Bekanntlich bildet jeder Isolator, der von zwei elektrisch leitenden Medien umgeben wird, einen Kondensator. Diese Verhältnisse treffen auch bei der Elektroden spitze zu, weil die Kunststoffbespannung und die aufgebaute Polarisations schicht einen Isolator darstellen, der einerseits von einem leitfähigen Elektrolyten (im Gewebe), andererseits von der Metallspitze der Elektrode eingeschlossen wird. Man muß sich die Elektrode in einem elektrischen Ersatzschaltbild als Parallelschaltung von Ohm'schen Widerstand und Kapazität darstellen. Die Elektrodenstrecke enthält also einen Gleichstromwiderstand, der dem P_{O_2} umgekehrt proportional ist und einen kapazitiven Widerstand, der in erster Linie von der Dicke der Kunststoffbeschichtung der Spitze abhängt.

Bei den von uns verwendeten Elektroden wurde die kapazitive Komponente mit ungefähr 100 pF ermittelt. Dies würde nach dem Ohm'schen Gesetz für Wechselstrom bei einer Frequenz von 1 KHz einen Wechselstromwiderstand von 1,6 M Ω ergeben.

$$R = \frac{1}{\omega \cdot c} = \frac{1}{2\pi \cdot f \cdot c} = \frac{1}{6,28 \cdot 10^3 \cdot 10^{-10}} = 1,6 \text{ [M}\Omega\text{]}$$

Der Wechselstromwiderstand der Elektrode ist also sehr viel kleiner als ihr Gleichstromwiderstand. Die Anstiegssteilheit der Spikes der Aktionspotentiale kann man un-

gefähr mit der Anstiegssteilheit eines sinusförmigen Wechselstromes mit einer Frequenz von 1 KHz vergleichen. Die Elektrode hat somit für die Registrierung der Spikes einen Widerstand, der höchstens bei einigen Megohm liegt und von der Frequenz abhängig ist.

Entsteht nun unter der Elektrodenspitze ein Aktionspotential, so muß diese Wechsellspannung den kapazitiven Elektrodenwiderstand überwinden und gelangt anschließend an die Eingangsbuchse des Gerätes. Hier findet nun zunächst eine Spannungsteilung über den Vorschaltwiderstand R_{10} und den Elektrodenwiderstand statt. R_{10} liegt über den niederohmigen Verstärkerausgang auf Masse. Da R_{10} mit 100 M Ω sehr viel größer ist als der kapazitive Elektrodenwiderstand (ca. 1 bis 2 M Ω), liegt die Spannung fast vollständig dem Elektrodenwiderstand an und wird von hier aus über die "Meßleitung" an den +Eingang des ersten Verstärkers herangeführt. Der Vorschaltwiderstand R_{10} stellt also für die Aktionspotential-Messung den Eingangswiderstand des Gerätes dar. Dieser Verstärker ist für den Spannungsteiler R_{10}/R_{EL} keine Belastung, weil der Eingangswiderstand dieses als Elektrometer geschalteten Verstärkers bei $10^{11} \Omega$ liegt. In dem ersten Rechenverstärker wird nun das Signal gemäß R_4/R_3 ca. 5-fach vorverstärkt und über eine Kapazität an R_{13} herangeführt. Dadurch gelangen nur die Wechsellspannungsanteile an den Verstärker OA 3, obwohl am Verstärkerausgang von OA 1 auch eine Gleichspannung zur Ansteuerung des Stellgliedes (Verstärker OA 2) vorhanden ist. Im Verstärker OA 3 wird jetzt eine 100-fache ($R_{14}/R_{13} = 100$) Nachverstärkung vorgenommen, um am Ausgang von OA 3 eine genügend hohe Spannung zum Betreiben eines Oszillographen und Aufzeichnungsgerätes zu haben.

Die Aktionspotentialanteile, die an den Verstärkereingang OA 2 gelangen, werden in diesem Verstärker wegen der großen Kapazität C_3 nicht mehr verstärkt. Sie erscheinen am Ausgang des OA 2 stark phasenverschoben und mit kleiner Amplitude, so daß sie gemäß R_{10}/R_{EL} fast vollständig über R_{10} abfallen und nicht mehr rückläufig die Elektrode erreichen.

Der Ohm'sche Eingangswiderstand ist mit dem Vorschaltwiderstand identisch und liegt bei $10\text{ M}\Omega$, $100\text{ M}\Omega$, $680\text{ M}\Omega$, $1000\text{ M}\Omega$, je nach Schalterstellung von S_2 .

Von seiten der Elektronik wird also die biologische Spannungsquelle bei der Ap-Ableitung so gut wie überhaupt nicht belastet.

Durch die abgeschirmte Verbindung zwischen der Elektrode und dem Gerät entstehen jedoch zum Eingang parallele Kapazitäten. Auch stellen die am Gerät vorhandenen Steckbuchsen und die Verdrahtung der Verstärker kleine kapazitive Komponenten dar, die praktisch unvermeidlich sind. Aus diesem Grunde sollte das Verbindungskabel zwischen Elektrode und Gerät, so kurz wie möglich sein.

Dennoch beträgt die Gesamtkapazität am Verstärkereingang ca. 100 pF , was hauptsächlich von der Länge der abgeschirmten Zuleitung zur Elektrode abhängt. Diese Eingangskapazität bringt einen zusätzlichen und kaum vermeidbaren Wechselstromwiderstand an den Eingang des Gerätes.

Abb. 12 zeigt schematisch den kapazitiven Elektrodenwiderstand C_{EL} und den kapazitiven Widerstand des gesamten Gerätes C_G . Man sieht, daß für den Fall $C_{EL} = C_G$ eine Spannungsteilung für Wechselspannungen im Verhältnis $1 : 1$ entsteht. Somit erreicht nur ungefähr die Hälfte der ursprünglichen Aktionspotentialamplitude den Verstärkereingang, was aber wegen des hohen Verstärkungsfaktors unwesentlich ist.

Die Linearität im Frequenzverlauf bei der Ap-Ableitung kann, wie in Abb. 13 dargestellt, geprüft werden. Die Gegenelektrode wird dabei mit einem Sinusgenerator verbunden und nun die Abhängigkeit des Verstärkungsfaktors von der Frequenz gemessen. Für die Ap-Registrierung sollte zwischen 100 Hz und 10 KHz ein etwa konstanter Verstärkungsfaktor vorliegen. Sinkt der Verstärkungsfaktor bei höheren Frequenzen ab, so kann man diesen Effekt durch eine Erniedrigung von C_5 ausgleichen. Sollte der Verstärkungsfaktor bei niedrigen Frequenzen zu stark abfallen, so kann man den Kondensator C_4 vergrößern, um den Frequenzgang zu linearisieren. Die Größen

für diese Kapazitäten werden am schnellsten experimentell ermittelt.

Durch das äußerst geringe Eigenrauschen der hochwertigen Rechenverstärker sind Eingangsspannungen in der Größenordnung von $100 \mu\text{V}$ ohne weiteres registrierbar.

Die kapazitive Spannungsteilung am Eingang des Gerätes kann vermieden werden, wenn für Verstärker OA 1 ein Verstärker mit negativer Kapazitätskompensation verwendet wird. Solche Verstärker enthalten intern eine kapazitive Gegenkopplung, mit deren Hilfe man Eingangskapazitäten kompensieren kann. Ein solcher Verstärker wird z. B. von der Firma TRANSYDINE, Ann Arbor Michigan 48103 USA, unter der Bezeichnung MP A - 2 hergestellt. Wird dieser Verstärker für OA 1 eingesetzt, so entfallen die Widerstände R_3 und R_4 , da sie in dem Verstärker bereits enthalten sind. Durch die Aufhebung der kapazitiven Spannungsteilung am Eingang des Gerätes müssen für diesen Fall die Linearisierungsglieder C_4/R_{13} und C_5/R_{14} neu dimensioniert werden. Dies geschieht am schnellsten experimentell. Die Schaltung von OA 3 ist die eines selektiven Verstärkers mit einer annähernd linearen Verstärkung im Bereich zwischen 100 Hz und 10 kHz, die erwähnten Widerstände und Kondensatoren müssen dann entsprechend ermittelt werden.

Diese Technik der negativen Kapazitätskompensation wurde jedoch nicht angewandt, da hierbei das Eigenrauschen des Systems erheblich ansteigt.

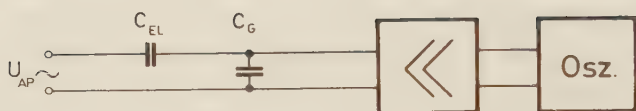


Abb. 12: Schematische Darstellung der kapazitiven Spannungsteilung über die Elektrodenkapazität C_{EL} und die Eingangskapazität des ableitenden Systems. C_G ist die Summe aus Eingangskapazität des Gerätes, Kapazität der abgeschirmten Zuleitung zur Elektrode und Eigenkapazität der Steckbuchse am Gerät. U_{AP} stellt die Aktionspotentialquelle dar.

SIMULTANE MESSUNG VON pO_2 UND AKTIONSPOTENTIALEN

VII. Gleichzeitige Registrierung des regionalen O_2 -Druckes und der Aktionspotentiale im Hirngewebe der Ratte

Zur Demonstration der Wirkungsweise des neuen Gerätes wurden der P_{O_2} und die Aktionspotentiale aus den basalen Teilen des Rattengehirns simultan registriert. Die Versuche wurden an tracheotomierten Albinoratten (Stamm: Wistar, Gewicht ca. 250 gr) durchgeführt. Die Tiere wurden vor der Operation mit 40 mg/kg Natriumpentobarbital narkotisiert. In die Schädelkalotte wurden kleine Löcher von 1 mm Durchmesser zum Einführen der Elektrode gebohrt. Der Kopf der Tiere wurde dann in die Halterung eines stereotaktischen Gerätes eingespannt. Ein Mikrotrieb (Fa. La Precision Cinématographique) gestattete es, die Elektrode in μ -Schritten vorzuschieben. Die Ratte atmete hierbei spontan aus einem Bypass und war auf eine 5 cm dicke Styroporplatte gelagert. Zur Durchführung der Versuche wurde das Tier mitsamt der stereotaktischen Einrichtung in einen sorgfältig geerdeten Maschendrahtkäfig gebracht. In diesem Käfig befand sich auch das Gerät zur simultanen P_{O_2} - und Aktionspotentialregistrierung. Das Gehäuse dieses Gerätes und die Metallteile der stereotaktischen Apparatur wurden geerdet. Die Geräte waren so in dem Käfig befestigt, daß die Zuleitung zur Gold- bzw. Platinelektrode mit ca. 15 cm sehr kurz war. Der Mikrotrieb des stereotaktischen Gerätes konnte über eine Drahtspirale von außen betätigt werden, so daß man während der Messung die Elektrode in μ -Schritten durch das Gewebe schieben konnte, ohne den Käfig zu öffnen. Die Elektrode wurde vor der Messung geeicht, sie wurde dazu in verschiedenen O_2 -gesättigte KCl-Lösungen eingetaucht und die entsprechenden Ausschläge an dem Schreiber wurden notiert. Außerdem war vor der Messung die Linearität der Wechselspannungsverstärkung, wie in Abb. 13 dargestellt, geprüft worden. Die Einführung der Elektrode in das Rattenhirn wurde unter optischer Kontrolle mittels eines Stereomikroskopes vorgenommen.

Neben dem geerdeten Maschendrahtkäfig befand sich in ca. 2 m Entfernung ein Schreiber (Fa. Rikadenki, Tokyo), ein Zweistrahloszillograph (Tektronix Typ 502 A) und ein hochwertiges Netzgerät zur Versorgung des im Käfig befindlichen Gerätes (Fa. Kontron). Außerdem wurde für die ersten Registrierversuche parallel zum Oszillographeneingang ein Tonbandgerät (UHER Report 4000 S) geschaltet, um

eine Möglichkeit zur Aktionspotentialaufzeichnung zu haben. Am Ausgang des Oszillographen wurde noch ein Niederfrequenzverstärker mit Lautsprecher angeschaltet. Dadurch konnten die momentan abgeleiteten Aktionspotentiale auch akustisch kontrolliert werden. Bei der Tonbandaufzeichnung der Aktionspotentiale besteht die Möglichkeit, die momentan abgeleiteten Signale mit den zuvor aufgezeichneten zu vergleichen. Hierzu kann der Ausgang des Tonbandgerätes mit dem zweiten Kanal des Oszillographen verbunden werden, so daß man die beiden Signale auf einem Bildschirm darstellen kann. In Abb. 14 sind vier Registrierbeispiele gegeben für die gleichzeitige P_{O_2} -Aktionspotential-Registrierung. Die Aufnahmen 1 und 2 zeigen Aktionspotentiale aus einem Gebiet mit ca. 1,8 Vol% O_2 -Sättigung, während die Aufnahmen 3 und 4 aus Gebieten mit ca. 2,3 Vol% O_2 -Sättigung stammen. Bei den 4 Photographien vom Oszillographen entspricht in horizontaler Richtung die Seitenlänge eines Quadrates einer Zeit von 0,2 sec, während in vertikaler Richtung ein Quadrat einer Spannung von 100 μV entspricht. Der Zeitpunkt der Aufnahme wurde an der P_{O_2} -Kurve notiert, so daß man nachträglich die Photographien den entsprechenden P_{O_2} -Werten zuordnen konnte. Außerdem wurde an der P_{O_2} -Kurve die Tiefe und Lage der Elektrode, sowie die momentane Stellung des aufzeichnenden Tonbandgerätes notiert.

Mit Hilfe der neuen Methode war es möglich, mittels einer Mikroelektrode den regionalen P_{O_2} und die Aktionspotentiale zu registrieren. Wesentlich hierbei ist, daß sich beide Messungen gegenseitig nicht überlagern oder stören.

Im Kapitel V wurde dargestellt, daß bei der P_{O_2} -Messung eine Veränderung der Polarisationsspannung um 1 % - 2 % auftreten kann. Diese mögliche Fehlanzeige ist aber bedeutungslos, da im Plateaubereich der Elektrode (vgl. Kap. I, Abb. 1 b) eine so kleine Veränderung der Polarisationsspannung keine Stromänderung bewirkt.

Andererseits wurde bei der Aktionspotentialmessung die Hochohmigkeit des Eingangskreises gewahrt. Der Ohm'sche Eingangswiderstand für die Aktionspotentialregistrierung liegt bei 10 M Ω bis 1 G Ω (je nach Schalterstellung von S_2). Diese Werte sind so

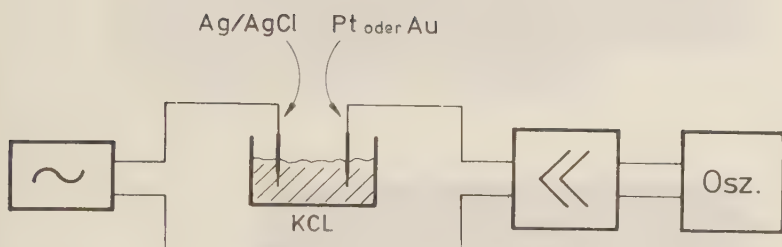
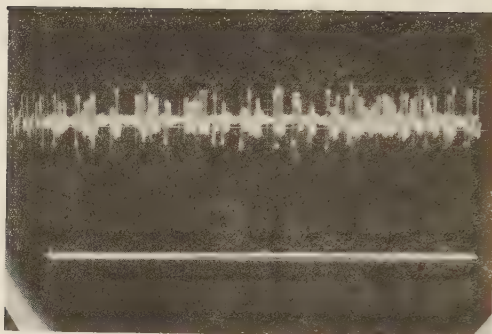
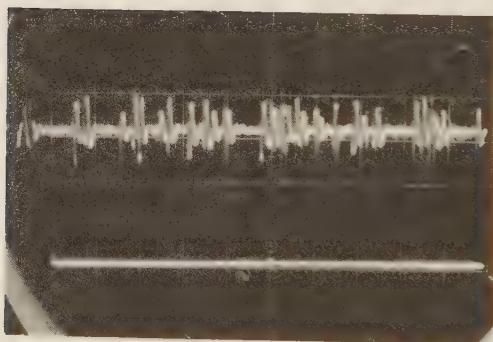


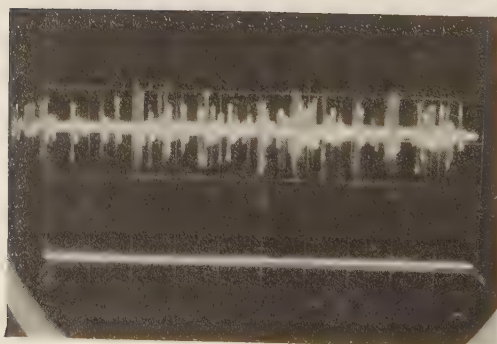
Abb. 13: Blockschaltbild zur Überprüfung und Einstellung des Frequenzganges der Wechselspannungsverstärkung. Eine Sinusgenerator liefert eine Spannung von 5 mV, variabel von 100 Hz bis 10 kHz. Dieses Signal gelangt über die Gegenelektrode, eine KCl - Lösung und die Mikroelektrode zum Verstärker. Die Kondensatoren C_4 und C_5 können nun so dimensioniert werden, daß der Oszillograph (Osz) zwischen 100 Hz und 10 kHz Sinusspannung etwa die gleiche Amplitude anzeigt. (Vergleiche Abb. 11 a)



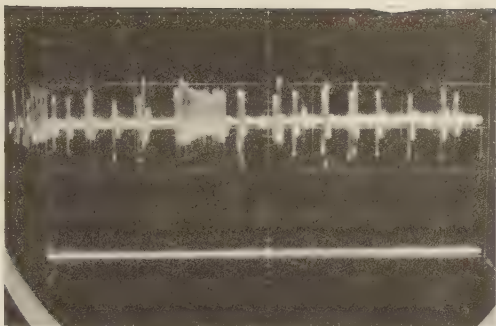
1



2



3



4

Abb. 14:

4 Registrierbeispiele

Horizontal: 1 Teilstrich = 0,2 sec

Vertikal: 1 Teilstrich = 200 μV

Bei den Fotos 1 und 2 zeigte der pO_2 - Schreiber einen Wert von 1,8 Vol% O_2 ,
bei den Fotos 3 und 4 einen Wert von 2,3 Vol% O_2

hoch, daß bei der Aktionspotentialregistrierung trotz der simultanen P_{O_2} -Messung keine zusätzlichen Energieverluste auftreten. Durch kapazitive Kopplungen wurden beide Meßgrößen hinreichend voneinander getrennt und über die beiden Ausgänge des Gerätes so wiedergegeben, als seien sie durch getrennte Systeme mit zwei Elektroden ermittelt worden.

VIII. Ausblick und Anwendung der neuen Methode

Die Möglichkeit zur gleichzeitigen P_{O_2} - und Aktionspotentialableitung mit derselben ultrafeinen Mikroelektrode eröffnet neue Möglichkeiten zur Untersuchung bisher ungelöster Fragen. Im folgenden seien einige der mit dieser Methode zu bearbeitenden Fragestellungen skizziert.

1) Hypoxie - Werte und elektrische Aktivität im Gehirngewebe

Untersuchungen der P_{O_2} -Verteilung im Gehirngewebe haben sehr häufig niedrige P_{O_2} -Werte um 1 mmHg ergeben. Es stellt sich die Frage nach der Funktionseinschränkung in diesen hypoxischen Bereichen. Als Kriterium kann die Aktionspotentialrate in diesen Gebieten gleichzeitig mit dem regionalen P_{O_2} gemessen werden.

2) Bestimmung der kritischen Schwelle

Ferner kann die Häufigkeit der Aktionspotentiale bei abnehmender inspiratorischer O_2 -Konzentration gemessen und nach einer Beziehung zwischen dem regionalen P_{O_2} und der Spike-Rate gesucht werden. Durch das Verschwinden der hirnelektrischen Aktivität bei einem bestimmten niedrigen P_{O_2} läßt sich eine "kritische Schwelle" definieren.

3) P_{O_2} -Aktivitätsraten-Beziehung am Glomus caroticum

Die Beziehung zwischen dem regionalen P_{O_2} im Glomus caroticum und der Spike-Rate ist noch unbekannt. Es besteht die Möglichkeit, Messungen direkt im Mikrobereich des P_{O_2} -Rezeptors durchzuführen und den Wirkungsmechanismus des Chemo-rezeptors auf diese Weise quantitativ zu analysieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein elektronisches Meßgerät beschrieben, das simultan die Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Hirngewebe und die Aktionspotentialsregistrierung mit derselben Mikroelektrode von 1 μ Spitzendurchmesser gestattet. Dabei ist es wesentlich, daß beide Meßgrößen gleichzeitig mit einer Elektrode erfaßt werden. Dadurch wird garantiert, daß beide Meßgrößen aus demselben Mikrobereich des Gewebes bzw. denselben Nervenzellen stammen.

Die polarografische P_{O_2} -Messung beruht auf einer Strommessung, die einen niederohmigen Meßkreis erfordert, während die Aktionspotentialsregistrierung wegen der geringen elektrischen Energieentwicklung einzelner Nervenzellverbände möglichst stromlos, d.h. hochohmig erfolgen sollte. Außerdem erfordert der hohe Übergangswiderstand an der Elektrodenspitze einen hochohmigen Verstärkereingang für die Aktionspotentialsregistrierung. Die Niederohmigkeit des Meßkreises ist ausschlaggebend für die Genauigkeit der P_{O_2} -Messung, und die Hochohmigkeit des Meßkreises ist für eine naturgetreue Wiedergabe der Aktionspotentiale unerlässlich. Diese extrem entgegengesetzten Forderungen wurden durch ein mit Rechenverstärkern bestücktes, elektronisches System ermöglicht.

Die Meßanordnung besitzt die folgenden meßtechnischen Eigenschaften:

Der gemeinsame Meßkreis ist für die Aktionspotentialsmessung hochohmig. Durch einen elektronischen Regelkreis wird der Spannungsabfall für Gleichspannung ausgeglichen. Die gewünschte Polarisationsspannung wird als Sollwert im Regelkreis vorgegeben. Der Istwert der Polarisationsspannung wird kontinuierlich gemessen und mit dem Sollwert verglichen. Durch diese selbsttätige aktive Regelung kann sich die Polarisationsspannung während der Messung um höchstens $\pm 1\%$ bis $\pm 2\%$ verändern. Diese Abweichung kann vernachlässigt werden, da im gewählten Spannungsbereich (Plateaubereich der Elektrode) eine kleine Polarisationsspannungsänderung nahezu keine Stromänderung, d. h. Fehlanzeige für die P_{O_2} -Messung, bewirkt.

Da die Anzeigegenauigkeit der Elektrode für die P_{O_2} -Messung ohnehin nur $\pm 5\%$ beträgt, ist die Genauigkeit des beschriebenen Meßsystems für die gekoppelte Messung genau so groß wie die bei der einfachen polarografischen P_{O_2} -Messung.

Bei der Aktionspotentialsmessung ist der Eingangswiderstand des Gerätes extrem hoch, da der Regelkreis nur auf Gleichspannungsänderungen anspricht. Die Aktionspotentiale können in demselben Meßkreis also belastungsfrei aufgenommen werden. Durch eine selektive Nachverstärkung wird der Frequenzgang des gesamten Systems einschließlich der Elektrode in einem Bereich von 100 Hz bis 10 kHz linearisiert. Dadurch konnten auch Unlinearitäten des Frequenzganges, die auf kleinen Kapazitäten im Eingangskreis beruhen, korrigiert werden.

Die beiden Meßgrößen P_{O_2} und Aktionspotentiale unterscheiden sich in erster Linie durch ihre zeitliche Änderungen. Bei der P_{O_2} -Messung beträgt diese größenordnungsmäßig 1 Hz, während die Aktionspotentiale Anstiegsteilheiten entsprechend 100 Hz bis 10 kHz mit sich bringen.

Die beiden Meßgrößen werden im elektronischen System durch kapazitive Koppelungen entsprechend ihres Frequenzunterschiedes getrennt und in zwei getrennten Kanälen verstärkt. Das Gerät besitzt zwei Ausgänge: Einen Ausgang zum Anschluß eines Kompensationsschreibers für die P_{O_2} -Registrierung und einen zweiten Ausgang zum Anschluß eines Oszillografen zur Darstellung der abgeleiteten Aktionspotentiale. Beide Meßkanäle sind voneinander getrennt und überlagern sich nicht gegenseitig.

Die Arbeitsweise des neuen Verfahrens wird exemplarisch durch Messungen im Rattengehirn demonstriert.

LITERATUR

- CATER, D. B. and J. A. SILVER: Microelectrodes and Electrodes used in Biology.
In: Reference Electrodes. Eds. J. J. Ives and J. J. Jany. New York
Academic Press 1961
- LÜBBERS, D. W.: Capillary Pattern and Oxygen Tension of the Cerebral Cortex
Acta neurol. Scand. Suppl. 14, 92 (1965)
- LÜBBERS, D. W.: Regional Cerebral Blood Flow and Microcirculation. In: Oxygen
Transport in Blood and Tissue. Eds. D. W. Lübbers, U. C. Luft,
G. Thews and E. Witzleb. Thieme - Verlag, Stuttgart 1968
- HEIDENREICH, J., W. ERDMANN, H. METZGER und G. THEWS: Local Hydrogen
Clearance and pO_2 - Measurements in Microareas of the Brain.
Experientia 26, 257 - 259 (1970)
- GLEICHMANN, U. und D. W. LÜBBERS: Die Messung des Sauerstoffdruckes in Gasen
und Flüssigkeiten mit der Pt-Elektrode unter besonderer Berücksichtigung
der Messung im Blut.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 271, 431 - 455 (1960)
- KOLTHOFF, J. M. and J. J. LINGANE: Polarography. Interscience Publishers
New York, London 1952
- GRUNEWALD, W.: Die Beeinflussung der pO_2 - Verteilung im Gewebe durch die pO_2 -
Messung mit der Pt - Elektrode.
Pflügers Arch. ges. Physiol. 312, R 144 (1969)
- METZGER, H. W. ERDMANN and G. THEWS: Effect of Short Periods of Hypoxia,
Hyperoxia and Hypercapnia on Brain O_2 Supply. J. Appl. Physiol. (in press)
- KRELL, W.: Eine neue Goldmikroelektrode für die pO_2 - Messung im Gewebe und ihre
Eichung. (In Vorbereitung)

Herrn Professor Dr. Dr. G. THEWS danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Erlaubnis, die vorliegende Entwicklung am Physiologischen Institut der Universität durchführen zu dürfen.

Herrn Dr. H. METZGER und Herrn Dr. W. ERDMANN danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 25. Mai 1946 wurde ich, Stefan Kunke, als Sohn des heutigen Polizeidirektors Bodo Kunke und seiner Ehefrau Helene, geb. Marcus in Wiesbaden geboren. 1952 wurde ich in die erste Klasse der Hebbel - Schule in Wiesbaden eingeschult. Ein Jahr später wechselte ich zur Jahn - Schule über. 1956 besuchte ich nach bestandener Aufnahmeprüfung die Sexta der Oranien - schule in Wiesbaden. In der Oberstufe wählte ich den mathematisch - naturwissenschaftlichen Zweig dieses Gymnasiums.

Im Februar 1965 bestand ich an der Oranien - schule die Reifeprüfung und immatrikulierte mich für das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg - Universität. Am 9. Oktober 1968 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Seit dem 3. klinischen Semester arbeitete ich im Physiologischen Institut der Johannes Gutenberg Universität (Direktor: Professor Dr. Dr. G. Thews) an meiner Dissertation.

